

(11)特許出願公告番号

特公平7-51550

(24) (44)公告日 平成7年(1995)6月5日

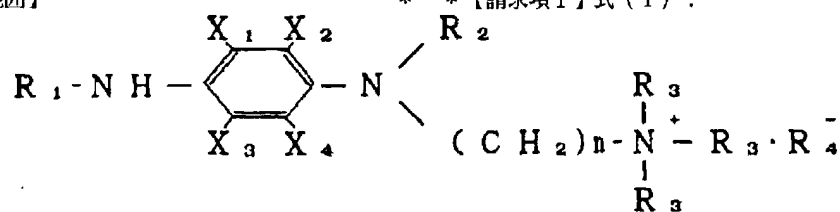
(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 C 237/10				
C 0 7 K 5/06	Z N A			
5/08				
5/10				
C 1 2 Q 1/37				

請求項の数 3 (全 10 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平1-296592	(71)出願人	999999999 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22)出願日	平成1年(1989)11月15日	(72)発明者	濱田 芳男 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀酵素工場内
(65)公開番号	特開平3-157353	(72)発明者	手嶋 真一 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀酵素工場内
(43)公開日	平成3年(1991)7月5日	(72)発明者	羽生 恒男 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀酵素工場内
		審査官	佐藤 修

(54) 【発明の名称】 新規なアミド化合物およびその用途

1 2
【特許請求の範囲】 * * 【請求項1】式（I）：



で表される新規なアミド化合物。

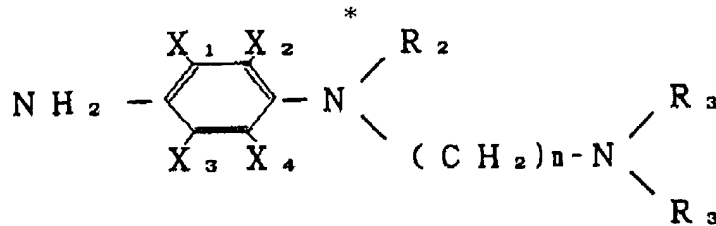
(式中、R₁はアミノ酸残基もしくは2～4個のアミノ酸残基を有するペプチド残基を示す。R₂は炭素数1～3個を有するアルキル基を示す。X₁, X₂, X₃, およびX₄は水素、アルキル基、アリル基、ハロゲン、ニトロ基またはカルボキシ基を示す。R₃は炭素数1～5個のアルキル基を示す。R₄は無機酸残基もしくは有機酸残基を示す。※

※nは1～6の整数である。）

【請求項2】遊離のカルボキシル基を少なくとも1個有する保護アミノ酸もしくは2～4個のアミノ酸残基を有する保護ペプチドと式(II)で表される芳香族アミノ化合物を反応させ、次いでハロゲン化アルキルを作用させて、脂肪族性アミノ基を第四級アンモニウム化させ、必要ならば脱保護し、さらに必要ならば無機酸または有機

酸を反応させることを特徴とする新規なアミド化合物の製造法

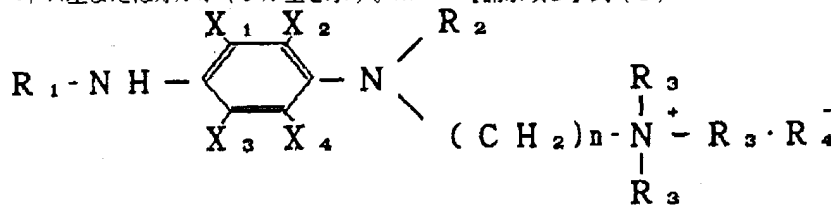
*式(II):



(式中、R₂は炭素数1〜3個を有するアルキル基を示す。X₁, X₂, X₃, およびX₄は水素、アルキル基、アリル基、ハロゲン、ニトロ基またはカルボキシル基を示す。*)

10※R₃は炭素数1〜5個のアルキル基を示す。nは1〜6の整数である。)

【請求項3】式(I)



で表される新規なアミド化合物を基質とする新規な酵素活性測定用試薬。

(式中、R₁はアミノ酸残基もしくは2〜4個のアミノ酸残基を有するペプチド残基を示す。R₂は炭素数1〜3個を有するアルキル基を示す。X₁, X₂, X₃, およびX₄は水素、アルキル基、アリル基、ハロゲン、ニトロ基またはカルボキシル基を示す。R₃は炭素数1〜5個のアルキル基を示す。R₄は無機酸残基もしくは有機酸残基を示す。nは1〜6の整数である。)

【発明の詳細な説明】

(産業上の利用分野)

本発明は新規なアミド化合物およびその製造法ならびにその用途に関する。

(従来の技術)

生体中に存在するロイシニアミノペプチダーゼ(以下、LAPと略する)、γ-グルタミルトランスぺプチダーゼ(以下、γ-GTPと略する)などの加水分解酵素およびプロテアーゼ前駆体および凝固因子などの測定は有用な診断情報を与えるものとして臨床的意義が高い。

従来のこれらの酵素活性の測定法として、例えばLAPやγ-GTPの基質としてアニリン誘導体を用いて、該酵素の働きで遊離したアニリン化合物をカブラーの存在下、ラッカーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、チロシナーゼ等の酸化酵素で発色させ、その吸光度の変化により、該酵素の活性を測定する酵素法が提案されている(特開昭59-88099号)。この方法は従来の化学法のもつ初速度測定ができない欠点をなくした方法であって、酵素活性測定法として優れている。しかし、この方法では基質、カブラー、酸化酵素を含む反応液の安定性が悪い。また、そのために使用するできるカブラー、基質、酸化酵素に制限があり、実用できる範囲が狭いものにならざる★50

20★るを得ない。例えばカブラーや基質としては保存安定性の劣化を防ぐために比較的酸化反応性の低い化合物を選ばなければならない。その結果、測定を必要感度が十分得られない欠点がある。また使用される酸化酵素も比較的酸化縮合反応性の低いものを使用しないとカブラーの劣化を生じさせるために酸化反応性の高い酸化酵素が使用できないという制約もある。

また、発色のために特別の操作を必要とせず、酵素により解裂すると同時に発色するもので従来から使用されてきたp-ニトロアニリドを発色基としてもつ基質では、測定波長が405nmであり、しばしば血清中の成分により妨害を受ける問題がある。またメチルクマリンアミドを発色基としてもつ基質も使用されているが、蛍光分光光度計が必要であり、現在最も普及している可視光での分光計を使用することができない。さらに従来の基質は溶解性が悪く、最大速度V_{max}濃度では測定できず、測定中、析出する場合がある。

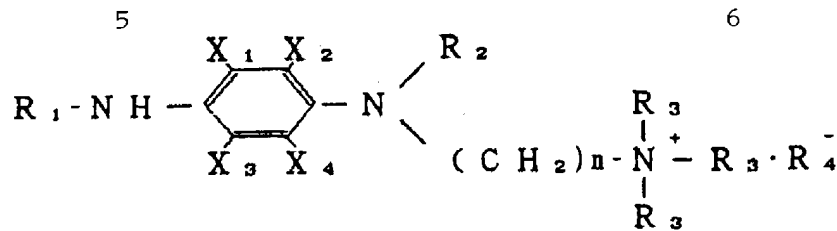
(発明が解決しようとする課題)

本発明は上記加水分解酵素およびペプチダーゼ前駆体あるいは凝固因子の測定法において、基質、カブラー、酸化酵素を含む反応液中での安定性に優れた基質であって、溶解性に優れ、さらに妨害物質の影響を受けにくい基質を見出すことにある。

(課題を解決するための手段)

本発明者らは下記式で表される新規なアミド化合物を見出し、この化合物が加水分解酵素およびペプチダーゼ前駆体あるいは凝固因子の活性測定用基質として優れた効果を示すことを見出し、本発明に到達した。すなわち本発明は

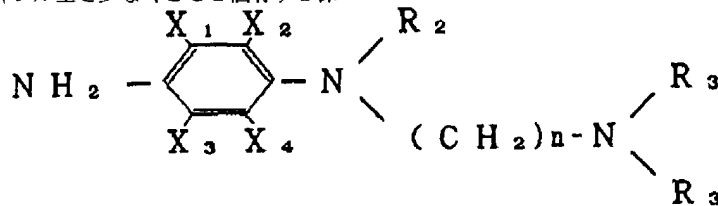
(1)式(I):



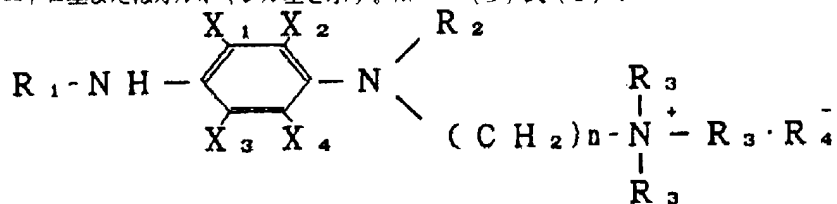
で表される新規なアミド化合物。

(式中、 R_1 はアミノ酸残基もしくは2～4個のアミノ酸残基を有するペプチド残基を示す。 R_2 は炭素数1～3個を有するアルキル基を示す。 X_1, X_2, X_3 , および X_4 は水素、アルキル基、アリル基、ハロゲン、ニトロ基またはカルボキシル基を示す。 R_3 は炭素数1～5個のアルキル基を示す。 R_4 は無機酸残基もしくは有機酸残基を示す。 n は1～6の整数である。)

(2) 遊離のカルボキシル基を少なくとも1個有する保*



(式中、 R_2 は炭素数1～3個を有するアルキル基を示す。 X_1, X_2, X_3 , および X_4 は水素、アルキル基、アリル基、ハロゲン、ニトロ基またはカルボキシル基を示す。*)



で表される新規なアミド化合物を基質とする新規な酵素活性測定用試薬。

(式中、 R_1 はアミノ酸残基もしくは2～4個のアミノ酸残基を有するペプチド残基を示す。 R_2 は炭素数1～3個を有するアルキル基を示す。 X_1, X_2, X_3 , および X_4 は水素、アルキル基、アリル基、ハロゲン、ニトロ基またはカルボキシル基を示す。 R_3 は炭素数1～5個のアルキル基を示す。 R_4 は無機酸残基もしくは有機酸残基を示す。 n は1～6の整数である。)

本発明の式(1)にて表される化合物は、 R_1 としてアミノ酸残基、例えばロイシル基、アルギニル基、システニル基、S-ベンジルシステニル基、アラニル基、γ-グルタミン基などを挙げることができる。2～4個のアミノ酸残基を有するペプチドとしては、イソロイシル-γ-グルタミン-グリシル-アルギニル基、D-フェニルアラニル-プロリル-アルギニル基、D-バリル-ロイシル-リシル基、グリシル-プロリル-アルギニル基、プロ★50

* 護アミノ酸もしくは2～4個のアミノ酸残基を有する保護ペプチドと式(II)で表される芳香族アミノ化合物を反応させ、次いでハロゲン化アルキルを作用させて、脂肪族性アミノ基を第四級アンモニウム化させ、必要ならば脱保護し、さらに必要ならば無機酸または有機酸を反応させることを特徴とする新規なアミド化合物の製造法。

式(II)：

※ R_3 は炭素数1～5個のアルキル基を示す。 n は1～6の整数である。)

(3) 式(1)：

★リル-フェニルアラニル-アルギニル基などを挙げることができる。 R_1 中のアミノ基はアルキルアミノ基、アリルアミノ基、アルカナミド基、アリルカルボキサミド基、アルキルオキシカルボキサミド基、アリルオキシカルボキサミド基、アリルオキシカルボキサミド基などで置換されていてもよい。 R_1 中のアミノ酸もしくはペプチドを構成しているアミノ酸はL型が望ましいが、D型でもよい。

R_2 の炭素数1～3個を有するアルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基などがある。 X_1, X_2, X_3, X_4 は水素、アルキル基、アリル基、ハロゲン、ニトロ基、カルボキシル基を示す。アルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基などがある。ハロゲンとしては、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素などがある。アリル基としては、フェニル基、p-ヒドロキシフェニル基、p-スルフォフェニル基などがある。 R_3 は炭素数1～5個を有するアルキル

基、例えばメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基などがある。R₄は無機酸残基もしくは有機酸残基を示す。有機酸としては塩を形成する能力があれば特に限定されないが、例えば、酢酸、トリフルオロ酢酸、トリクロロ酢酸、コハク酸、クエン酸、酒石酸、乳酸などを挙げることができる。

式(I)で表される新規なアミド化合物としては、ロイシル-ETP、ベンゾイル-ETP、システニル-ETP、S-ベンジルシルテニル-ETP、アラニル-ETP、γ-グルタミル-ETP、ベンゾイル-イソロイシル-グルタミル-グリシル-アルギニル-ETP、D-フェニルアラニル-プロリル-アルギニル-ETP、D-バリル-ロイシル-リシル-ETP、トシル-グリシル-プロリル-アラギニル-ETP、ベンゾイル-プロリル-フェニルアラニル-アルギニル-ETPなどが挙げられる(ETPとは、4-[N-エチル-N-(2-トリメチルアンモニウムエチル)]アミノアニリド基のトリフルオロ酢酸塩を示す)。

本発明の化合物を製造する方法としては、遊離のカルボキシル基を少なくとも1個有する保護アミノ酸もしくは2~4個のアミノ酸残基を有する保護ペプチドと式(I)で表される芳香族アミノ化合物を反応させ、次いでハロゲン化アルキルを作用させて、脂肪族性アミノ基を第四級アンモニウム化させ、必要ならば脱保護し、さらに必要ならば無機酸または有機酸を反応させることによりアミド化合物を製造する方法がある。

遊離のカルボキシル基を少なくとも1個有する保護アミノ酸としては、たとえばベンジルオキシカルボニル-ロイシン、t-ブチルオキシカルボニル-ロイシン、ベンジルオキシカルボニル-システイン、t-ブチルオキシカルボニル-システイン、ベンジルオキシカルボニル-システイン、t-ブチルオキシカルボニル-システイン、ベンジルオキシカルボニル-S-ベンジルシステイン、t-ブチルオキシカルボニル-S-ベンジルシステイン、ベンジルオキシカルボニル-アラニン、t-ブチルオキシカルボニル-アラニン、ベンジルオキシカルボニル-グルタミン酸-α-ベンジルエステル、t-ブチルオキシカルボニル-グルタミン酸-α-ベンジルエステルなどがある。

2~4個のアミノ酸残基を有する保護ペプチドとしては、ベンゾイル-イソロイシル-γ-ベンジル-グルタミル-グリシル-N^ε-(メシチレン-2-スルホニル)-アルギニン、t-ブチルオキシカルボニル-D-フェニルアラニル-プロリル-N^ε-(メシチレン-2-スルホニル)-アルギニン、ベンジルオキシカルボニル-D-バリル-ロイシル-ε-N-ベンジルオキシカルボニル-リギン、t-ブチルオキシカルボニル-グリシル-プロリル-N^ε-(メシチレン-2-スルホニル)-アルギニン、t-ブチルオキシカルボニル-プロリル-フェニルアラニル-N^ε-g-(メシチレン-2-スルホニル)

-アルギニンなどがある。

式(II)で表される芳香族アミノ化合物としては、N-エチル-N-(2-ジメチルアミノエチル)-p-フェニレンジアミン、N-プロピル-N-(2-ジメチルアミノエチル)-p-フェニレンジアミン、N-エチル-N-(2-ジメチルアミノエチル)-2-カルボキシ-4-アミノ-アニリン、N-エチル-N-(2-ジメチルアミノエチル)-2-スルホ-4-アミノ-アニリンなどが挙げられる。

上記保護アミノ酸または保護ペプチドと式(II)で表される化合物を反応させる条件は、通常、ペプチド合成で使用されるものであれば、すべて適用できる。すなわち適当な溶媒中で縮合剤を作用させる方法がある。

縮合剤としては、ジシクロヘキシルカルボジイミド、塩化イソブチルオキシカルボニル、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキノリンなどが挙げられる。この場合、溶媒は原料や縮合剤を溶解するものが望ましいことはいふまでもない。反応温度は、縮合剤の種類に応じて-40℃~+40℃まで選ぶことができる。また保護アミノ酸もしくは保護ペプチドの有するカルボキシル基を活性化し、アミノ基と縮合させる方法がある。活性化方法としては、活性エステル法、アジド法などがある。溶媒、反応温度は、それぞれの活性化方法に適したものを選ぶことができる。

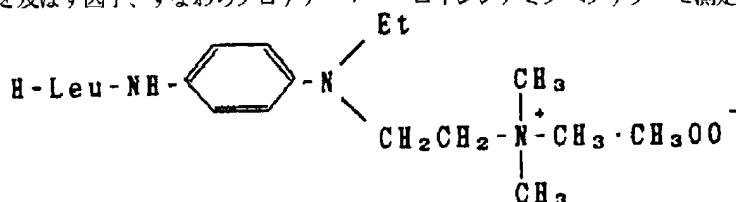
本発明の製造法では、上記反応により得られたアミド化合物をハロゲン化アルキルと反応させ、脂肪族性アミノ基を第四級化させて第四級アンモニウム塩類とする。必要により、ペプチドの保護基を脱保護する。さらに必要ならば、その他の無機酸または有機酸で塩を置換する。

ここで使用するハロゲン化アルキルとしては、塩化メチル、塩化エチル、塩化プロピル、臭化メチル、臭化エチル、臭化プロピル、ヨウ化メチル、ヨウ化エチル、ヨウ化プロピルなどがある。無機酸としては、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硝酸、硫酸などを挙げることができる。有機酸としては、酢酸、トリフルオロ酢酸、トリクロロ酢酸、コハク酸、クエン酸、酒石酸、乳酸などを挙げることができる。

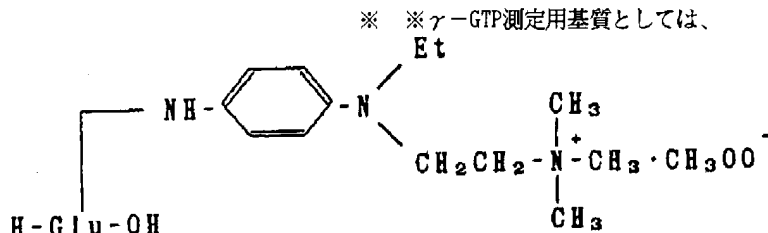
本発明の化合物はアミノ酸またはペプチドが結合するアミド結合が解離することにより、脂肪族性アミノ基が第四級化されたアニリン化合物を生成する。該化合物は酸化剤または酸化酵素の存在下にカプラーと反応して色素を生成する。従って本発明の新規な化合物は、LAP、γ-GTP、トリプシン、キモトリプシン、エラスターゼ、凝固因子(第XII因子、X因子、VII因子、VIII因子、IX因子、カリクレイン、トロンビン、ウロキナーゼなど)の活性測定用基質として使用することができる。また本発明の化合物を使用して、プロテアーゼ前駆体およびプロテアーゼ不活性型の凝固線溶因子(プレカリクレイン、プロトロンビン、プラスミノゲン、第X因子

など)、そのアクチベーター(第X因子はVipera russe
lli proteinaseもしくは第IXaの因子、プロトロンビン
は第Xaの因子、プラスミノーゲンはウロキナーゼでそれ
ぞれ活性化される)を活性化し、活性後のプロテアーゼ
活性を測定することにより、プロテアーゼ前駆体および
凝固因子を定量分析することができる。

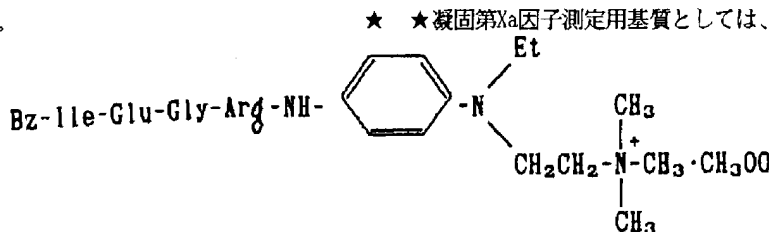
また酵素活性に影響を及ぼす因子、すなわちプロテアー*



などが挙げられる。



などが挙げられる。



などが挙げられる。

本発明の酵素活性測定用試薬は上記新規なアミノ化合物
のほかに、カプラーおよび酸化酵素または酸化剤を含
む。

カプラーとしては、アニリン誘導体あるいはフェノール
誘導体がある。このような化合物は測定溶媒に対する溶
解性、発色時の色素の安定性および吸収極大値を有する
ものが好ましい。カプラーとしては、例えば、N-エチ
ル-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-ア
ニシジン、N-エチル-N-スルホプロピル-m-ア
ニシジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スル
ホプロピル)-m-アニシジン、N-エチル-N-スル
ホプロピルアニリン、N-スルホプロピルアニリン、N
-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジ
メトキシアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ
-3-スルホプロピル)-m-トリイジン、N-エチル
-N-スルホプロピル-m-トリイジンなどを挙げるこ
とができる。特に、p-位に置換基を有しない芳香族ア
ミンが好ましい。N-エチル-N-(2-ヒドロキシ
-3-スルホプロピル)-m-トリイジンなどが好まし☆50

* ぜもしくはプロテアーゼ不活性型の凝固線溶因子に対す
るインヒビターおよびアクチベーターも本発明の化合物
を利用して活性測定をおこなうことができる。これらの
例としては、プラスミノーゲン活性化因子、エンドキ
シン、アンチトロンビンIII、ヘパリン、各種プロテイン
インヒビターがあげられる。

ロイシニアミノペプチダーゼ測定用基質としては、

☆い。フェノール誘導体としては、フェノール、o-ヒド
ロキシベンゼンスルホン酸、o-ヒドロキシ安息香酸な
どがあげられる。

酸化剤としては、フェリシアン化カリ、過ヨウ素酸ナト
リウム、塩化第一鉄がある。

酸化酵素としては、ラッカーゼ、アスコルビン酸オキシ
ダーゼ、ビリルビンオキシダーゼ、ポリフェノールオキ
シダーゼ、アミノフェノールオキシダーゼ、チロシナー
ゼなどを挙げるができる。ラッカーゼとしては、ウ
ルシやコリオラス(Coriolus)属産生のもの(特開昭58
-47489号)などがある。アスコルビン酸オキシダーゼ
としては、カボチャやキュウリ由来のもの(特開昭56-
88793号)などがある。ビリルビンオキシダーゼとして
は、ミロセシウム(Myrothecium)属由来のもの(Agri
c. Biol. Chem. 45, 2383 (1981))などがある。

本発明の酵素測定用試薬は上記アミド化合物、カプラー
および酸化酵素または酸化剤を一液としてもよいし、第
一試薬は酸化剤または酸化酵素を含み、第二試薬や上記
アミド化合物およびカプラーを含むようにしてもよい。
本発明の酵素測定用試薬を用いて、酵素活性を測定する

11

方法は、試料に本発明の酵素測定用試薬を添加して、上記アミド化合物から遊離したアミノ化合物を酸化剤または酸化酵素の存在下にカプラーと反応した色素を生成させ、その吸光度を測定する。本発明により生成する色素は、一般に650~750nmの波長を有し、さらには溶解性に優れ、最大速度 V_{max} 濃度での測定ができる。また本発明では酵素反応のために緩和な条件で測定できる。本発明では吸光度測定を精度の高い初速度法で定量することが望ましい。

(実施例)

以下本発明を実施例を用いて説明する。

実施例中、略号は以下の化合物を示す。

Ile :L-イソロイシン

Glu :L-グルタミン酸

Gly :グリシン

Arg :L-アルギニン

Bz :ベンゾイル

Bzl :ベンジル

Mts :メチレン-2-スルホニル

PMZ :p-メトキシベンジルオキシカルボニル

BOC :t-ブチルオキシカルボニル

Np :p-ニトロアニリド

Troc:トリクロロメチルオキシカルボニル

DMF :N,N-ジメチルホルムアミド

THF :テトラヒドロフラン

IBCF:塩化イソブチルクロホルムレート

12

*TFA:トリフルオロ酢酸

TMSOTf:トリメチルシリルトリフラート

Z :ベンジルオキシカルボニル

実施例1

γ -GTPの基質の合成

1a.N-エチル-N-(2-ジメチルアミノエチル)-4-ニトロアニリンの製造

p-ニトロフルオロベンゼン5g, N,N-ジメチル-N'-エチルエチレンジアミン5.4g, および無水炭酸カリウム

10 4.9gをDMF8mlで5時間還流させた。クロロホルムで抽出後、シリカゲルカラムクロマトで精製し、黄色油状物質7.3gを得た。(86.8%)

200MHz¹H-NMR

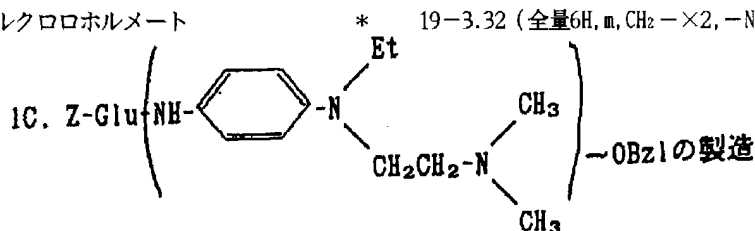
δ ppm:1.223 (3H, t), 2.305 (6H, s), 2.498 (2H, t), 3.42-3.53 (4H, m), 6.582および8.075 (全量4H, d \times 2)

1b.N-エチル-N-(2-ジメチルアミノエチル)-p-フェニレンジアミンの製造

上記1a.で得たN-エチル-N-(2-ジメチルアミノエチル)-4-ニトロアニリン7.2gをc-塩酸70mlに溶解した。これに四塩化錫35gをエタノール40mlに溶解したものを加えた。炭酸カリウムでアルカリ性とし、酢酸エチルで抽出後、シリカゲルカラムクロマトで精製した。黄色状物質6.1gを得た。(収率95%)

200MHz¹H-NMR

δ ppm:1.077 (3H, t), 2.266 (6H, s), 2.420 (2H, t), 3.19-3.32 (全量6H, m, CH₂ \times 2, -NH₂), 6.640 (4H, s)



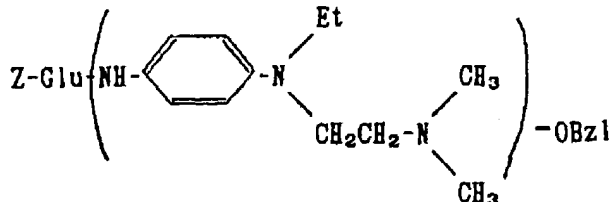
N-ベンジルオキシカルボニル-O-ベンジルーグルタミン (Z-Glu-OBzl) 5gをTHF50mlに溶解し、トリエチルアミン2.1mlを加えた。-30℃で塩化イソブチルクロホルムレート (IBCF) を加え、30分後上記2b.で得たN-エチル-N-(2-ジメチルアミノエチル)-p-フェニレンジアミンを2.8g加えた。一夜放置後、クロロホルムで抽出し、酢酸エチル-エーテルで再結晶し、白色※40

※結晶4.7gを得た。(収率62.3%) 元素分析およびC₃₂H₄₀O₆N₄からの理論値は、次の値が得られた。

H=7.18% (7.19%), C=68.71% (68.55%), N=9.85% (9.99%)

1d.Z-Glu(-ETP)-OBzlの製造

上記1cで得られた



4.16gをクロロホルムの飽和溶液とした。ヨウ化メチル1.5gを加え、2日間放置した。減圧濃縮後、酢酸エチルを加えて結晶化させた。白色結晶5.68gを得た。(収率9★50

★8%)

元素分析およびC₃₃H₄₃O₆N₄Iからの理論値は、次の値が得られた。

13

H=6.19% (6.17%), C=56.16% (56.41%),
N=8.04% (7.97%)

1e. γ -グルタミル-ETP (TFA塩) の製造

上記1d. で得た Z-Glu (-ETP) -OBzl 3.5g に m-クレゾール 3.5ml、チオアニソール 8.47ml、トリフルオロ酢酸 (TFA) 48ml、トリメチルシリルトリフラート (TMSOTf) 20ml を 0℃ において順次加えた。1 時間後、エーテルを加えて沈殿させた。沈殿をろ取し、逆相カラムで精製後、凍結乾燥し、白色粉末 1.8g を得た。

200MHz ¹H-NMR

δ ppm: 1.112 (3H, t), 2.25 (2H, m), 2.60 (2H, m), 3.179 (3H, s), 3.45 (4H, m), 3.85 (3H, m), 7.041 及び 7.419 (全量 4H, d × 2)

実施例 2 γ -GTP の定量

血漿中の γ -GTP の測定

試薬の調整

基質溶液; 合成基質 γ -グルタミル-ETP (TFA塩) 5mg/ml

N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トリスリン 5mg/ml

0.01M Na₂HPO₄-0.005M クエン酸緩衝液 (pH3.0)

ラッカーゼ溶液: ラッカーゼ 5U/ml

0.2M トリエタノールアミン塩酸緩衝液 (pH7.45)

手順

血漿 10 μ l をラッカーゼ溶液 2ml で希釈し、37℃ で 3 分間インキュベーションした。次いで基質溶液 0.5ml を加えた。37℃ で 685nm における吸光度の変化率もしくは、一定時間後の吸光度を測定した。

濃度既知の γ -GTP 溶液を用い、同様の操作で検量線を作成した。(第 1 図)

検量線からの検体の γ -GTP の濃度を求めた。

実施例 3 凝固因子第 Xa 因子の基質の合成

① Na-p-メトキシベンジルオキシカルボニル-アルギニル-4-(N-エチル-N-(2-ジメチルアミノエチル)) アミノアニリドの合成

Na-p-メトキシベンジルオキシカルボニル-N^e- (メシチレン-2-スルホニル)-アルギニン 5g を THF 20ml に溶解し、トリエチルアミン 1.47ml を加えた。-30℃ で IBCF 1.4ml を加え、-15℃ で 30 分間放置した。-30℃ で、N-エチル-N-(2-ジメチルアミノエチル)-p-フェニレンジアミン 1.5g を THF 10ml に溶解させたものを加えた。クロロホルムで抽出し、飽和炭酸水素ナトリウム水、蒸留水で順次洗浄した。乾燥後、減圧濃縮し、クロロホルム-石油エーテルで再結晶した。白色粉末 4.6g を得た。

② Na-(メシチレン-2-スルホニル)-アルギニル-4-(N-エチル,N-(2-ジメチルアミノエチル)) アミノアニリド・トリフルオロ酢酸塩の合成
上記化合物 ① 4.6g およびアニソール 4.5ml を懸濁し、0℃ で TFA 25ml を加えた。0℃ 1 時間攪拌後、減圧濃縮し

14

た。残渣を減圧でよく乾燥させた。これを直ちに ③ の反応に用いた。

③ Na-ベンゾイル-イソロイシル- γ -ベンジル-グルタミル-グリシル-N^e- (メシチレン-2-スルホニル)-アルギニル-4-(N-エチル,N-(2-ジメチルアミノエチル)) アミノアニリドの合成

常法により合成した Na-ベンゾイル-イソロイシル- γ -ベンジル-グルタミル-グリシンヒドラジド 3.6g を DMF 100ml に溶解した。-30℃ で 4.14N HCl/DMF 溶液を加えた。亜硝酸イソアミル 1ml を加え、-5 ~ 0℃ で 1 時間放置した。-30℃ で トリエチルアミン 2.1ml を加えて中和した。上記化合物 ② を DMF に溶解し トリエチルアミンで中和したものを滴下し一夜放置した。反応液を減圧濃縮し、クロロホルムで抽出した。NaHCO₃ 水蒸留水、で順次洗浄し、乾燥後減圧濃縮した。酢酸エチルで再結晶し白色結晶 3.5g を得た。

④ Na-ベンゾイル-イソロイシル- γ -ベンジル-グルタミル-グリシル-N^e- (メシチレン-2-スルホニル)-アルギニル-4-(N-エチル,N-(2-トリメチルアンモニウムエチル)) アミノアニリドヨウ化物の合成。

上記化合物 ③ 3g をクロロホルムの飽和溶液とした。これにヨードメタン 450mg を加えて一夜放置した。減圧濃縮し残渣に酢酸エチルを加えて結晶化させた。淡黄色結晶 2.95g を得た。

⑤ Na-ベンゾイル-イソロイシル-グルタミル-グリシル-アルギニル-4-(N-エチル,N-(2-トリメチルアンモニウムエチル)) アミノアニリド酢酸塩、(Bz-Ile-Glu-Arg-ETP 酢酸塩) の合成。

④ 100mg に 0℃ において m-クレゾール 0.12ml、チオアニソール 0.265ml、TFA 1.5ml、TMSOTf 0.427ml を順次加えた。0℃、1 時間放置した。過剰のエーテルを加え、沈殿させた。沈殿物を少量の蒸留水に溶解し、pH を 4 に調整した後、セファデックス G-15 ゲル濾過カラム (1N 酢酸溶出) 精製後、CM-セファデックス C-25 (酢酸アンモニウム 0.01M ~ 0.5M グラジェント) 精製し、凍結乾燥により白色粉末 50mg を得た。

実施例 4 血漿中の凝固因子第 Xa 因子の定量

試薬の調整

基質溶液: 合成基質 Bz-Ile-Glu-Arg-ETP (酢酸塩) 5mg/ml

N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トリスリン 5mg/ml

0.01M Na₂HPO₄-0.005M クエン酸緩衝液 (pH3.0)

ラッカーゼ溶液: ラッカーゼ 5U/ml

0.2M トリエタノールアミン塩酸緩衝液 (pH7.45)

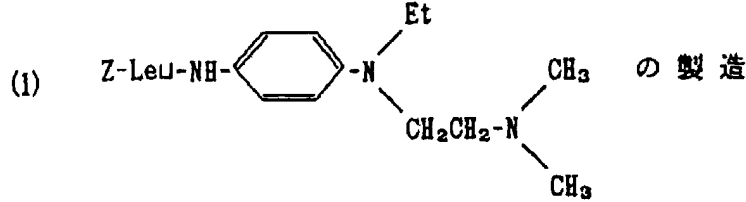
手順

血漿 10ml をラッカーゼ溶液 2ml で希釈し、37℃ で 3 分間インキュベーションした。次いで基質溶液 0.5ml を加えた。37℃ で 685nm における吸光度の変化率もしくは、一

15

定時間後の吸光度を測定した。

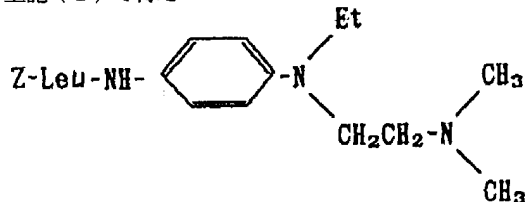
濃度既知の凝固第Xa因子溶液もしくは正常人の血漿を用い同様の操作で検量線を作成した(第2図)。検量線から*



ベンジルオキシカルボニル-L-ロイシン5gをTHF50mlに溶解し、トリエチルアミン2mlを加えた。-30℃で塩化イソブチルクロホルム2.8gを加えた。30分後、N-エチル-N-(2-ジメチルアミノエチル)-p-フェニレンジアミン2.7gを加えた。一夜放置後、クロホルムで抽出した。酢酸エチル-エーテルで再結晶し、白色結晶7gを得た。(収率81.7%)

(2) Z-Leu-ETP・I⁻の製造

上記(1)で得た



6gをクロホルムの飽和溶液とし、ヨウ化メチル2gを加え、2日間放置した。減圧濃縮後酢酸エチルを加えて、結晶化させた。白色結晶7.9gを得た。(収率96%)

(3) H-Leu-ETP (酢酸塩)

上記(2)で得たZ-Leu-ETP・I⁻1gにm-クレゾール1ml、チオアニソール2.4ml、トリフルオロ酢酸13.7ml、トリメチルシリルトリフラート5.7mlを、0℃において順次加えた。1時間後、エーテルを加えて沈殿させた。沈殿を濾取し、逆相カラムで精製後、凍結乾燥により白色粉末500mgを得た。

実施例6

※

16

*ら検体の凝固第Xa因子の濃度を求めた。

実施例5

LPA基質の合成

※LAPの測定

(1) 試薬の調整

基質溶液; 合成基質H-Leu-ETP (酢酸塩) 5mg/ml

N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トリイジン5mg/ml

0.01M Na₂HPO₄-0.005Mクエン酸緩衝液 (pH3.0)

ラッカーゼ溶液; ラッカーゼ5U/ml

0.2Mトリエタノールアミン塩酸緩衝液 (pH7.45)

(2) 手順

20 サンプル20μlをラッカーゼ溶液で希釈し、37℃で3分間、インキュベーションした。基質溶液0.5mlを加えた。37℃で685nmにおける吸光度の変化率を測定した。濃度既知LAP溶液を用い、同様の方法で検量線を作成した。(第3図)

検量線から検体のLAPの濃度を求めた。

(発明の効果)

本発明では加水分解酵素、ペプチダーゼ前駆体あるいは凝固因子の測定用基質として、安定性、溶解性、妨害物質の影響の少ない新規な化合物を提供することができる。本発明の酵素活性測定用試薬は、従来の酵素法に比較して、測定中に基質の析出がなく、最大速度V_{max}での測定ができる。

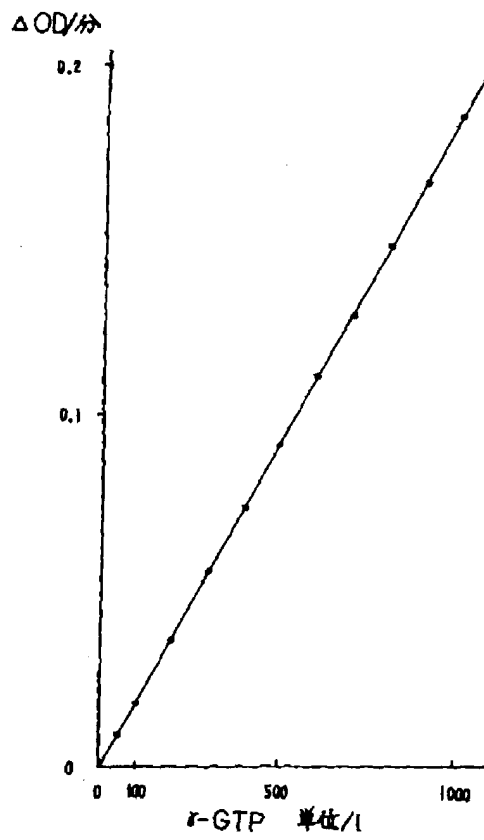
【図面の簡単な説明】

第1図はγ-GTPの検量線を示す。

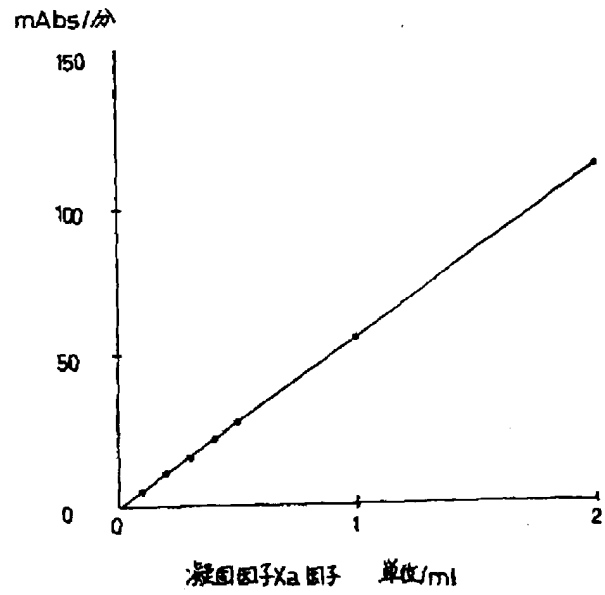
第2図は凝固因子第Xa因子の検量線を示す。

第3図はLAPの検量線を示す。

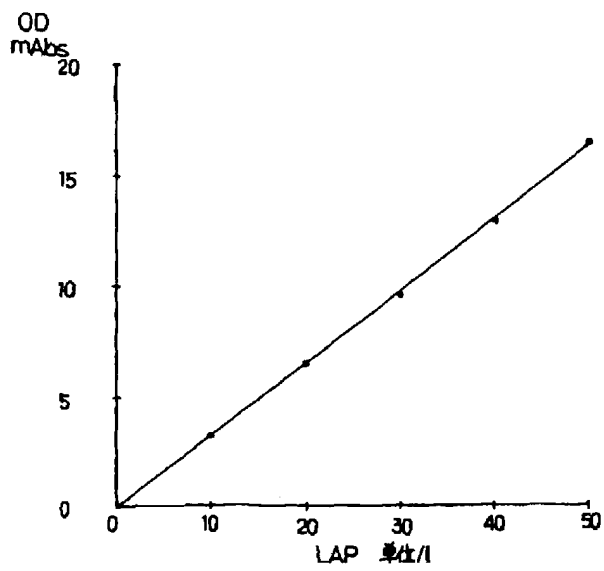
【第1図】



【第2図】



【第3図】



(10)

特公平7-51550

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

片内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 Q 1/56